

УДК 579.841.11:575.113

В.Б. Туркутюков¹, Л.А. Балабанова², Э.В. Слабенко¹¹Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),²Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100-летия, 159)

ИНДИКАЦИЯ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* МЕТОДОМ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ

Ключевые слова: госпитальные штаммы, *Pseudomonas aeruginosa*, полиморфизм, гены.

Изучены 27 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* путем анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов ДНК в полимеразной цепной реакции с применением эндонуклеаз рестрикции. Наиболее удобной для типирования близкородственных штаммов псевдомонад оказалась рестрикция гена *EcoY* ферментом Sal I. Это позволяет рекомендовать его для выявления источника и установления механизмов передачи инфекции.

Феномен полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) хромосомной ДНК позволяет определить генетическое разнообразие определенной части генома и дифференцировать один штамм близкородственных микроорганизмов от другого [1, 2, 4]. С помощью рестрикционного анализа можно выявить источник инфекции и исследовать механизм ее передачи, так как ПДРФ как эпидемиологический маркер обладает большей стабильностью, чем, например, плазмидный профиль микроорганизмов [1].

Материал и методы. Для установления этиологической значимости в развитии инфекционного процесса при внутрибольничных инфекциях и мониторинга формирования и циркуляции госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* были отобраны 27 штаммов, в том числе 16, полученных из внешней среды отделений реанимации и интенсивной терапии. Для анализа сайтов рестрикции гена *EcoY*, кодирующего белок секреторной системы III, и генов *LasA* и *LasB*, кодирующих протеазы, методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов для каждого исследуемого гена использовались эндонуклеазы рестрикции Pst I, Sal I, Sac I (Psp B124 I), Bgl II, Nco I (Bsp19 I) [4, 5].

Аmplифицированные фрагменты полимеразной цепной реакции (ПЦР) чистили в 1% агарозном геле, используя маркер ДНК 100bp+1,5kb фирмы «СибЭнзим». После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием. Полоску геля, содержащую фрагмент ДНК, соответствующий размеру гена, вырезали и помещали в эппендорф при –20°C на 1 час. Затем центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант (1–2 мкл) брали в инкубационную смесь для амплификации чистого продукта в тех же условиях, но с меньшим количеством циклов (20). После окончания ПЦР в инкубационную смесь добавляли 1/10 ацетата натрия 3М и 2,5 объема этанола для кон-

центрирования фрагментов и удаления буфера ДНК-полимеразы. Выпавшие в осадок фрагменты реакции перерастворяли в 25 мкл дистиллированной воды. На рестрикцию брали по 5 мкл раствора ПЦР-фрагментов, 2 ед. рестриктазы, 3 мкл соответствующего рестриктазного буфера и доводили дистиллятом до 30 мкл. Рестрикционную инкубационную смесь оставляли при 37°C на ночь. Анализ рестриктыв проводили в 1% агарозном геле, фотоснимки делали с помощью трансиллюминатора и камеры Herolab (Германия).

Праймеры и эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) синтезированы ООО «СибЭнзим» (г. Новосибирск). ПЦР-ПДРФ были выполнены в лаборатории морской биохимии ТИБОХ (завлабораторией канд. биол. наук В.А. Рассказов). В работе использован кластерный анализ, с помощью которого были построены горизонтальные древовидные диаграммы [3].

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Исследование гена *LasA* (фермент Pst I) ДНК штаммов *P. aeruginosa* свидетельствовало о том, что идентичные фрагменты рестрикции выявлены только у штаммов 64, 60 и 55, из которых последний являлся причиной пневмонии у больного, а два других были идентичны и выделены из окружающей среды (рис. 1). Это позволило подтвердить участие штаммов, выделенных из больничной среды, в развитии внутрибольничной пневмонии. Остальные штаммы были разнообразны по сайтам. Таким образом, данный фермент рестрикции не позволил выявить разнообразие штаммов и провести эпидемиологический мониторинг формирования и циркуляции госпитальных штаммов.

При использовании фермента рестрикции Bgl II выявлено родство штаммов 60 и 46, из которых последний был выделен из мокроты от больного с пневмонией (рис. 2), и родство не выявлено у штаммов 62 и 61. Ген *LasA* ДНК остальных штаммов, подвергнутых исследованию, не фрагментировался.

Исследования гена *LasA* с помощью фермента Sal I также не позволили выявить разнообразие

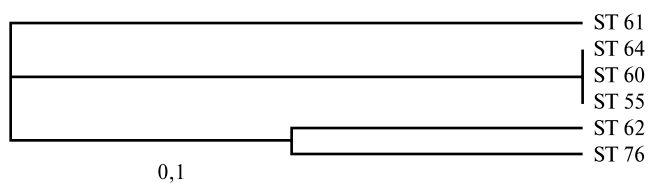


Рис. 1. Дендрограмма результатов анализа ПДРФ различных штаммов (ST) *P. aeruginosa*, имеющих в составе генома *LasA* (фермент рестрикции Pst I).

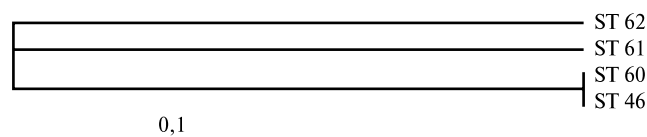


Рис. 2. Дендрограмма результатов анализа ПДРФ различных штаммов (ST) *P. aeruginosa*, имеющих в составе генома *LasA* (фермент рестрикции Bgl II).

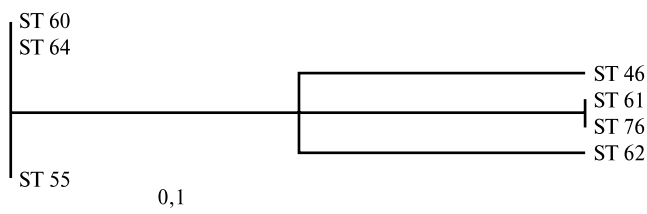


Рис. 3. Дендрограмма результатов анализа ПДРФ различных штаммов (ST) *P. aeruginosa*, имеющих в составе генома *LasA* (фермент рестрикции Sal I).

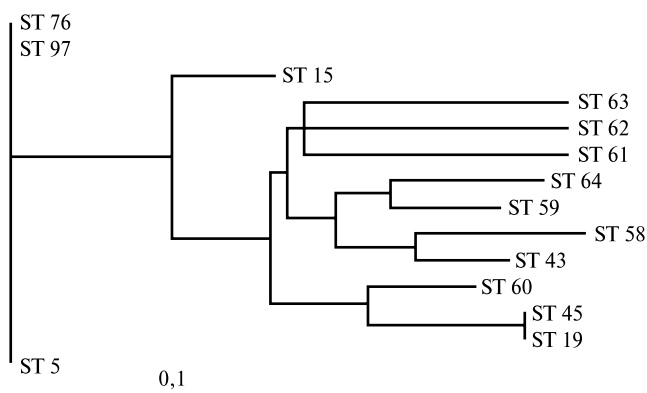


Рис. 4. Дендрограмма результатов анализа ПДРФ различных штаммов (ST) *P. aeruginosa*, имеющих в составе генома *ExoY* (фермент рестрикции Nco I).

штаммов *P. aeruginosa*, кроме 61-го и 76-го. Штамм 76 был выделен из трахеостомы пациента с внутрибольничной пневмонией, а штамм 61 — из внешней среды отделения (рис. 3).

При исследовании гена *LasB* с помощью ферментов рестрикции Pst I, Sal I, SacII (Psp B124 I), Bgl II, Nco I (Bsp 19 I) установлено, что штаммы или не подвергались рестрикции, или процесс носил лавинообразный характер, не позволяя идентифицировать и дифференцировать фрагменты. При исследовании гена *ExoY* с помощью ферментов рестрикции Pst I, Sal I, SacII (Psp B124 I), Bgl II, Nco I (Bsp 19 I) было установлено их выраженное генетическое разнообразие только с помощью рестриктаз Nco I и Sal I.

Так, при проведении рестрикционного анализа гена *ExoY* ферментом Nco I были выявлены общие сайты рестрикции у штаммов 45-го и 19-го геновариантов — этиологических факторов внутрибольничной пневмонии. Однако псевдомонады, выделенные из объектов больничной среды, имели иной молекулярный спектр фрагментов ДНК, он был идентичным у штаммов 61, 62 и 63-го геновариантов (рис. 4.).

Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в отделении реанимации и интенсивной терапии Городской клинической больницы № 2 из внешней среды и от боль-

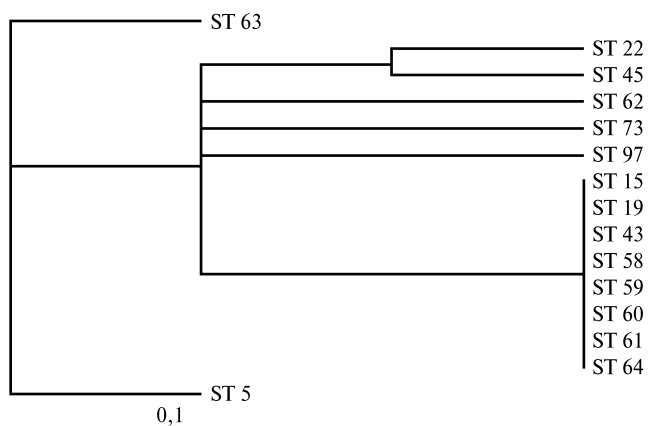


Рис. 5. Дендрограмма результатов анализа ПДРФ различных штаммов (ST) *P. aeruginosa*, имеющих в составе генома *ExoY* (фермент рестрикции Sal I).

ных с пневмониями, имели фрагменты разной молекулярной массы. При изучении гена *ExoY* ДНК штаммов *P. aeruginosa* с помощью фермента Sal I получены результаты, позволившие провести дифференцировку большинства из них (рис. 5). В результате были выявлены три группы близкородственных штаммов: первая — штаммы 22 и 45 (оба возбудители пневмонии), вторая — штаммы 62, 73 и 97 (73-й — возбудитель внутрибольничной пневмонии), третья — штаммы 15, 19, 43, 58, 59, 60, 61 и 64 (19 и 43 выделены от пациентов с внутрибольничной пневмонией). Штаммы 5 (внутрибольничная пневмония) и 63 (внешняя среда) оказались вне генотиповых связей среди исследованных геновариантов *P. aeruginosa*.

На основании полученных данных можно утверждать, что штаммы 15, 58, 59, 60, 61 и 64 *P. aeruginosa* являются родственными, так как имеют идентичные фрагменты рестрикции гена *ExoY*.

Таким образом, молекулярно-генетические исследования факторов вирулентности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов больничной среды и из клинического материала от лиц с внутрибольничными пневмониями, указывают на то, что полиморфизм геновариантов не позволяет проводить мониторинг формирования и циркуляции госпитальных штаммов и выявить источник инфекции. Применение метода анализа ПДРФ позволило установить, что наиболее удобным для типирования близкородственных штаммов *P. aeruginosa* является рестрикция гена *ExoY* ферментом Sal I. Это позволяет рекомендовать его для выявления источника и установления механизмов передачи инфекции.

Литература

1. Гинцбург А.Л., Ильина Т.С., Романова Ю.М. QUORUM SENSING социальное поведение бактерий // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 2003. № 5. С. 86–93.
2. Гинцбург А.Л., Шагинян И.А. Роль молекулярно-генетических технологий в повышении качества диагностики инфекционных заболеваний // Внутриутробные инфекции плода и новорожденного: мат. Всерос. конф. Саратов, 2000. С. 47–49.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1998. 460 с.

4. Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. ПЦР-генетическое титрование возбудителей бактериальных инфекций // Генетика. 1995. № 31. С. 600–610.
5. Tamm M., Todisco T., Feldman C. et al. Clinical and bacteriological outcomes in hospitalised patients with community-acquired pneumonia treated with azithromycin plus ceftriaxone, or ceftriaxone plus clarithromycin or erythromycin: a prospective, randomised, multicentre study // Clin. Microbiol. Infect. 2007. Vol. 13, No. 2. P. 162–171. Поступила в редакцию 06.03.2008.

INDICATION OF THE HOSPITAL STRAINS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BY THE METHOD OF THE RESTRICTION ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF GENES

V.B. Turkutyukov¹, L.A. Balabanova², E.V. Slabenko¹

¹ Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Pr. Vladivostok 690002 Russia), ² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far East branch of the Russian Academy of Sciences (159 100-letiya Pr. Vladivostok 690022)

Summary — The 27 strains of the *Pseudomonas aeruginosa* by the analysis of polymorphism of lengths of the restricted DNA fragments in polymerase chain reaction with application of the endonucleases of the restriction were investigated. The most convenient for typing of the closely related strains of pseudomonads appeared the restriction gene ExoY by the enzyme Sal I. It allows recommending it for the revealing of a source and establishing of the mechanisms of infection transmission.

Key words: hospital strains, *P. aeruginosa*, polymorphism, genes.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 1, p. 59–61

УДК 616.24-006.6-078.33

Ю.В. Соболева

Краевой клинический центр онкологии (680000 г. Хабаровск, Воронежское шоссе, 164)

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ, АПОПТОЗА И МЕЖКЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ ПРИ ЦЕНТРАЛЬНОМ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

Ключевые слова: плоскоклеточный рак легкого, пролиферативная активность, апоптоз, межклеточная адгезия.

Исследованы иммуногистохимические маркеры пролиферативной активности (Ki67 и топоизомераза $\Pi\alpha$), апоптоза (p53) и межклеточной адгезии (Е-кадгерин) у 212 больных плоскоклеточным раком легкого. Выявлено различие биологических свойств центральных и периферических опухолей, заключающееся в характере взаимодействия между изучаемыми маркерами. При центральном раке уровень межклеточной адгезии коррелировал с экспрессией маркеров пролиферативной активности и апоптоза, тогда как при периферическом раке подобная зависимость не прослеживается. При центральном раке без метастазов в лимфатических узлах уровень экспрессии Е-кадгерина был связан только с экспрессией Ki67, а при поражении лимфатических узлов — с топоизомеразой $\Pi\alpha$ и p53.

Необходимость индивидуализировать подходы к лечению рака легкого является актуальной проблемой онкологии. Поиск дополнительных прогностических факторов предполагает изучение различных клинических, морфологических и молекулярно-биологических маркеров, характеризующих опухоль как систему. Известны клинические различия между центральным и периферическим плоскоклеточным раком легкого (ПРЛ). Обсуждается вопрос о различии их метастатических характеристик, однако биологические особенности этих новообразований на морфогенетическом уровне изучены недостаточно [1, 2, 4]. Наиболее важными факторами, определяющими агрессивность рака легкого, считаются маркеры пролиферации, апоптоза и межклеточной адгезии [3–7]. В настоящей работе проведено сравнение уровней экспрессии вышеуказанных маркеров и их взаимосвязей при центральном и периферическом ПРЛ.

Материал и методы. Использованы образцы первичных опухолей от 200 мужчин и 12 женщин в воз-

расте от 42 до 77 лет. В 121 случае был диагностирован периферический, в 91 случае — центральный ПРЛ.

После операций изучались серийные криостатные срезы новообразований с использованием первичных моноклональных антител и вторичной системы детекции фирмы Novocastra. Применялись маркеры пролиферативной активности (Ki67 и топоизомераза $\Pi\alpha$), апоптоза (p53) и межклеточной адгезии (супрессор инвазивности Е-кадгерин). Оценка уровней экспрессии Ki67, топоизомеразы $\Pi\alpha$ и p53 проведены методом определения соотношения обозначенным ДНК-связывающим красителем (DAB) ядер к неокрашенным из расчета на 1000 ядер опухолевых клеток в 10 полях зрения и выражалась в процентах. Экспрессия Е-кадгерина оценена полуколичественно: окраска менее 5% опухолевых мембран — в 1 балл, более 5% — в 2 балла, менее 50% — в 4 балла и более 50% — в 6 баллов. Статистический анализ проведен в пакете программ Statistica 6.0. Сравнение размеров первичной опухоли и иммуногистохимических показателей выполнено с использованием критерия Манна–Уитни. Иммуногистохимические исследования выполнены на базе Института повышения квалификации специалистов здравоохранения, г. Хабаровск (ректор — проф. С.Ш. Сулейманов).

Полученные результаты и их обсуждение. Уровни экспрессии Ki67, топоизомеразы $\Pi\alpha$, p53 и Е-кадгерина при центральном и периферическом ПРЛ оказались одинаковыми, достоверные различия зарегистрированы только для p53 — уровень его экспрессии в периферических новообразованиях оказался в 1,32 раза выше.

При центральном раке имела корреляция между уровнями экспрессии Ki67, топоизомеразы $\Pi\alpha$ и p53 с экспрессией Е-кадгерина — т.е. по мере увеличения количества пролиферирующих клеток степень межклеточной адгезии повышалась. При периферических